

⑨ 日本国特許庁 (JP)

① 特許出願公開

② 公開特許公報 (A)

昭59—148798

⑤Int. Cl.³
C 07 H 21/02
21/04

識別記号

序内整理番号
7252-4C
7252-4C

④公開 昭和59年(1984)8月25日
発明の数 2
審査請求 未請求

(全 10 頁)

⑤ビオチンスクレオチド誘導体およびその製造法

②特 願 昭58—22516

②出 願 昭58(1983)2月14日

②発明者 三好健一

広島県高田郡甲田町下甲立1624
湧永製薬株式会社中央研究所内

②発明者 鈴木正則

広島県高田郡甲田町下甲立1624
湧永製薬株式会社中央研究所内

②発明者 不破亨

広島県高田郡甲田町下甲立1624
湧永製薬株式会社中央研究所内

②出願人 湧永製薬株式会社

大阪市福島区福島三丁目1番39
号

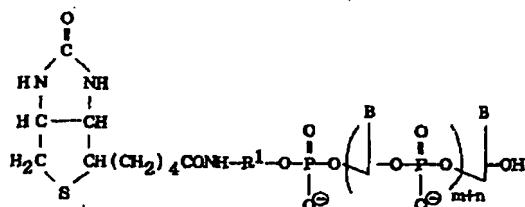
②代理人 弁理士 猪股清 外3名

明細書

1. 発明の名称 ビオチンスクレオチド誘導体
およびその製造法

2. 特許請求の範囲

1. 下式 [VI] で示されるビオチン-オリゴデオキシリボスクレオチドであることを特徴とする、
ビオチンスクレオチド誘導体。



〔ただし、m および n はそれぞれ 0 または任意の自然数であり、R¹ は 2 個の直鎖または分岐鎖の炭化水素基であり、B はスクレオチドを構成する塩基である (B が複数個存在するときは、

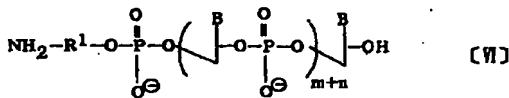
それらは同一でも異なるつてもよい)。〕

2. 塩基 B がアミン、チミン、シトシンおよびダニンからなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第 1 項記載のビオチンスクレオチド誘導体。

3. R¹ が炭素数 2 ~ 20 の直鎖または分岐鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のビオチンスクレオチド誘導体。

4. m が 0 または 6 までの自然数、n が 0 または 40 までの自然数である、特許請求の範囲第 1 ~ 3 項のいずれか一項に記載のビオチンスクレオチド誘導体。

5. 下式 [VII] で示されるオリゴスクレオチド誘導体の末端アミノ基にビオチンを結合させて下式 [VI] で示されるビオチン-オリゴデオキシリボスクレオチドを得ることを特徴とする、ビオチンスクレオチド誘導体の製造法。



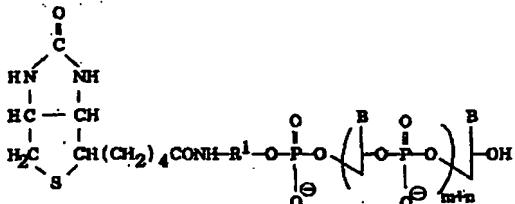
発明の背景

技術分野

本発明は、一般に、ビオチンスクレオチド誘導体に関する。さらに具体的には、本発明は、スクレオチドの塩基以外の部分にビオチンを結合させてなるビオチンスクレオチド誘導体に関する。本発明は、また、このようなビオチンスクレオチド誘導体の製造法にも関する。

先行技術

ビオチンはビタミン B 複合体の一つであつてビタミン H とも呼ばれ、多くの動植物の生育に必要な物質である。一方、ビオチンは卵白中のアビジンと強力に相互作用を行なうことが知られており、その点に着目してビオチンをその誘導体の形で利用するものとしてたとえばビオチン-アビジン試薬がある。これは、細胞あたりの抗原密度の測定、ラジオイムノアッセイおよびエンザイムイムノアッセイ等の生化学試薬として応用されている。また、ビオチンと核酸とを結合させた、感染および遺伝疾患の診断用 DNA プローブが開発され (Proc.



[V]

6. アミノ基とビオチンとの結合をアミノ基とビオチン活性エステルとの反応によつて行なう、特許請求の範囲第 5 項記載の方法。
7. ビオチン活性エステルがビオチンスクレオチドまたはビオチン-パラニトロフェニルエステルである、特許請求の範囲第 6 項記載の方法。
8. アミノ基とビオチンとの結合を結合剤の作用下に行なう、特許請求の範囲第 5 項記載の製造法。
9. 結合剤がジンクロヘキシルカルボゾイミドである、特許請求の範囲第 8 項記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

Natl. Acad. Sci. USA 78, 6633-6637

(1981))、市販化されるに至つている。この DNA プローブにおける、ビオチンスクレオチド誘導体の製造は、シテジントリホスフェート (dTTP) のビオチン誘導体をシテジントリホスフェートの代わりに使用して酵素的に DNA あるいは RNA を錠型にして行なつたものである。

しかし、本発明者らの知るところによれば、このようにして製造されるビオチンスクレオチド誘導体には下記のような問題点がある。

- イ、スクレオチドの塩基部分にビオチンを含有するため使用オリゴスクレオチド固有の解離温度 (Tm 値) に変化を生じる。
- ロ、シトシン誘導体の合成が困難である (上記文献より)。
- ハ、任意でかつ定められた塩基配列をもつ DNA の合成が困難である。

これらの理由によつて、現段階でのビオチン-スクレオチド誘導体は、その応用範囲が狭く、有用性が限定されているのが現状である。

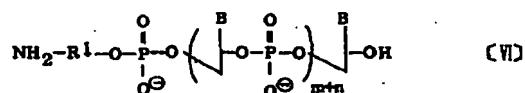
発明の概要

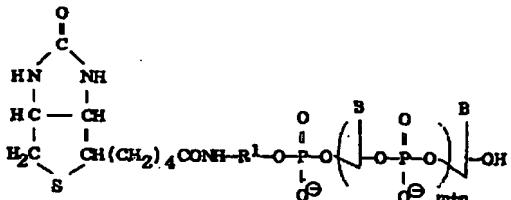
要旨

本発明は上記の点に解決を与えることを目的とし、特定のオリゴデオキシリボスクレオチドのスクレオチド塩基以外の特定部位にビオチンを結合させてなるビオチンスクレオチド誘導体によつてこの目的を達成しようとするものである。

従つて、本発明によるビオチンスクレオチド誘導体は下式 [VI] で示されるビオチン-オリゴデオキシリボスクレオチドであること、を特徴とするものである。

また、本発明によるビオチンスクレオチド誘導体の製造法は、下式 [VII] で示されるオリゴスクレオチド誘導体の末端アミノ基にビオチンを結合させて下式 [VIII] で示されるビオチン-オリゴデオキシリボスクレオチドを得ること、を特徴とするものである。





[組]

[ただし、 m および n はそれぞれ0または任意の自然数であり、 R^1 は2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、Bはスクレオチドを構成する塩基である（Bが複数個存在するときは、それらは同一でも異なつてもよい）。]

効果

本発明者らの合成したビオチン-オリゴデオキシリボスクレオチドは、前記核酸用非放射性アフイニティープローブの短所を回避することができて、下記のような長所をもつものである。

イ、スクレオチドの塩基部分にビオチンを含有しないので融解温度（ T_m 値）に変化を生じることがなくて安定である。

ロ、いかなる塩基配列をもビオチン-オリゴスクレオチドも合成可能である。

ハ、プローブとして短鎖オリゴマーで十分である。
ニ、合成が非常に簡単であつて、大量合成が可能である。

ホ、プライマー（鏡型合成の際のDNA断片）としても利用できる。

このような長所があるところから、本発明によればビオチンスクレオチド誘導体の利用方法の拡大も考えられる。すなわち、例えば、ビオチン-オリゴスクレオチドは非放射性核酸用アフイニティープローブとして、あるいはプライマーとして利用可能であることは前記したところであつて、その検出方法も抗体による沈降、酵素の活性測定、アピジン-セフアロースによるアフイニティカラム螢光性染色体による可視化等々、多様であり、また放射性プローブ（ ^{32}P ）に比べて被曝の危険、コスト、廃棄物の処理および保存性等の点で有利である。

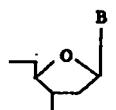
発明の具体的説明

ビオチンスクレオチド誘導体（Ⅷ）

本発明によるビオチンスクレオチド誘導体は、前記の式[組]で示されるものである。

式中、記号Bは、2'-デオキシリボスクレオ

シドの3'-および5'-水酸基を除いたデオキシリボスクレオシド残基を示すのに慣用されているものであつて、具体的には下記の構造のものである。



置換基Bはスクレオチドを構成する塩基を示し、通常はアデニン、チミン、シトシンまたはグアニンである。化合物[組]中にBが複数個存在するときは、それらは同一でも異なつてもよい。

m および n は、それぞれ0または自然数を示す。本発明ビオチンオリゴスクレオチド誘導体の重合度が $m+n$ で表示されているのは、本発明の好みの製造法で重合度がそれぞれ m および n のフ

クションを組合させていることによるものである（詳細後記）。その場合の m は実用的には0~6、特に1~4、 n は実用的には0~40、特に0~20、である。

基 R^1 は、化合物[組]の核酸部分とビオチン部分とを連結する2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基である。これは、特に炭素数2~20程度の直鎖または分岐鎖のアルキレン基が適当である。好みの R^1 は、炭素数2~6のアルキレン基である。

化合物[組]の合成

一般的説明

化合物[組]、すなわち本発明によるビオチンスクレオチド誘導体、は合目的的な任意の方法によつて合成することができる。

一つの好みの方法は、前記の式[組]のオリゴスクレオチド誘導体、すなわちオリゴデオキシリボスクレオチドの5'-末端リン酸基に基 R^1 を介して一级アミノ基が導入されたもの、のアミノ基にビオチンを結合させることからなるものである。

一方、式[組]の化合物は、オリゴスクレオチド

の合成および生成オリゴスクレオチドの5'-水酸基延長上での一级アミノ基の導入からなる方法で合成することができる。

第1図は、この好ましい合成法の一例を示すフローチャートである。フローチャート中の記号は、下記の意味を持つ（その意味ないし詳細は、後記した通りである）。

R⁰ リン酸基を保護する置換基であつて、通常オルトクロロフェニル基が用いられる。

R¹ 二価の炭化水素残基である。

R² 5'-末端水酸基の保護基であつて、通常シメトキシトリチル基が用いられる。

R³ 他のすべての保護基が安定な条件で容易に脱離されて、リン酸ジエステルを与えることができる置換基であつて、通常シアノエチル基が用いられる。

R⁴ アミノ基の保護基であつて、通常トリフルオロアセチル基が用いられる。

q nより小さい任意の自然数。

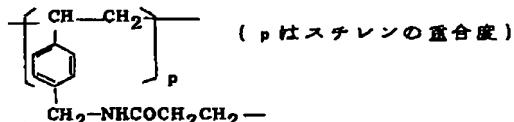
m 0または任意の自然数。

a 0および任意の自然数。

B 塩基を示す。

B' 保護された塩基を示すが、通常はN⁶-ベンジルアデニン、N-イソブチリルアミニ、N⁶-ベンジルシルトシンおよびチミン（すなわち、保護不變）より選択される。

~~②スペーサーを介した組合であつて、通常は下記のものである。



BIOT[†] ビオチン活性エスチル

化合物[V]の合成

一般にオリゴスクレオチド合成法としては、トリエステル法、ホスファイト法およびそれぞれの固相法および液相法がある。本発明者らは既に固相法によるオリゴスクレオチドを確立しており、化合物[V]の合成には本発明者らの下記の方法が

好ましい。

Tetrahedron Letters 1979, 3635 (1979)

Nucleic Acids Research 8, 5473 (1980)

Nucleic Acids Research 8, 5491 (1980)

Nucleic Acids Research 8, 5507 (1980)

Nucleic Acids Research Symposium Series

7, 281 (1980)

また、上記で合成したオリゴスクレオチドの5'-水酸基にリン酸基を介して一级アミノ基を導入する方法すなわち、化合物[V]の合成法としては、たとえば本発明者らの特願昭57-138136号明細書記載の方法がある。

化合物[V]の合成法をその一実施態様について示せば、下記の通りである。すなわち、第1図に示したように、化合物[I]の保護基R³を除去したものと化合物[I]の保護基R²を除去したものとを組合させ、これらの操作をくり返すことによつて、化合物[V]を合成する。オリゴスクレオチド化合物[I]の合成法は、上記の通り公知である。

一方、本発明者らの方法（特願昭57-138136

号明細書参照）に従つて、式[V]の化合物を合成する。すなわち、化合物[I]のR²を除去して5'-水酸基化合物とし、これにリン酸化剤（たとえば、ホスホジトリアゾリド、ホスホジクロリドまたはホスホジベンジトリアゾリド等）を作用させてリン酸化し、ついでアミノ基が保護されているアミノアルコール化合物R²-NH-R¹-OH（この化合物はオメガ-アミノアルコール（NH₂-R¹-OH）のアミノ基をR²で保護することにより得ることができる）を組合させることにより、化合物[V]を得ることができる（詳細は該明細書参照）。

この化合物[V]の保護基R³を除去し、化合物[I]の保護基R²を除去したものとを組合させて、化合物[V]を合成する。組合は、化合物[I]の合成の際の組合と本質的には変わらない方法で行なうことができる。

このようにして合成された化合物[V]の保護基をすべて除去すれば、化合物[V]が得られる。保護基COR⁴基、リン酸トリエステル中のオルト-クロロフェニル基および塩基部分のアシル基は、

0.5Mのテトラメチルダニン-ビリジン-2-カルボアルドキシムのジオキサン-水(9:1, V/V)溶液で処理後、アルカリ処理(塩アノニア水)を行なうことにより除去される。R⁴がトリフルオロアセチル基の場合は、アノニア処理により充分脱離されるが、オルトニトロフェニルスルfonyl基である場合はメルカブトエタノール処理が必須である。R⁴として他の保護基を用いた場合は、オリゴスクレオチド部分が安定な条件で、さらに別の処理を加えることも可能である。なお、デオキシオリゴリボスクレオチドの合成法は既に各種のものが公知であつて、保護基の種類およびその導入ないし除去ならびに結合その他のについて上記以外の詳細は該職の化学合成に関する成書や総説たとえば「スクレオシド・スクレオチドの合成」(丸善1977年)、「核酸有機化学」(化学同人1979年)、「核酸」(明倉書店1979年)、*Tetrahedron*, 34, 3143(1978)、有化、34, 723(1978)および化学の領域、33, 566(1979)等を参照することができる。

化合物[V]の合成

ビオチン-オリゴデオキシリボスクレオチド(化合物[V])は、上記化合物[VI]の5'-末端延長上の一級アミノ基にビオチンを結合させることによつて得ることができる。

両者の結合はビオチンのカルボキシル基と化合物[VI]のアミノ基との間の脱水によるアミド結合の形成を実現することのできる任意の方法によつて行なうことができる。化合物[VI]中にビオチンのカルボキシル基との反応が可能なアミノ基または水酸基が存在するときは、それらを適当に保護した状態でこの反応を行なうことができる。従つて、本発明で「式[VI]で示されるオリゴスクレオチド誘導体の末端アミノ基にビオチンを結合させて式[V]で示されるビオチン-オリゴスクレオチドを得る」という表現は、化合物[V]がこのように保護されている場合をも包含するものである。また、この表現は、ビオチンがその機能的誘導体の形にある場合をも包含するものである。ビオチンの機能的誘導体の具体例は、その酸ハライドま

たはその活性エステルである。

このような意味でのアミノ基とビオチンとの結合を行なわせる一つの好ましい方法は、アミノ基とビオチン活性エステルとの反応によることからなるものである。ビオチン活性エステルが好ましいのは、一般に、オリゴスクレオチドの塩基部分のアミノ基とは反応しないで5'-水酸基末端延長上の一級アミノ基とのみ選択的に反応し、しかも反応操作が簡便だからである。「ビオチン活性エステル」とは他の官能基(通常アミノ基)と反応しやすいエステル結合を持つビオチン誘導体を意味し、具体的にはスクシンイミド-、パラニトロフェニル-、ベンゾトリアゾリド-、2,4,5-トリクロロフェニル-エステル等がある。前二者が好ましい。

アミノ基とビオチンとの結合を行なわせる他の好ましい方法の一つは、両者の結合を縮合剤の存在下に行なうことからなるものである。縮合剤として適当なもの例を挙げれば、ジシクロヘキシカルボクシイミド、カルボニルイミダゾール、ウツ

ドワード試薬"K"等がある。ジシクロヘキシカルボクシイミドが好ましい。

いずれの方法による場合にも、反応方法は合目的的な任意のものであります。所与の反応系に対する具体的な反応方法は、後記実験例および各種の成書、たとえば、「ペプチド合成」(丸善1975年)および「タンパク質の化学」(1977年)を参照して適当に定めればよい。

実験例

1) フローチャート

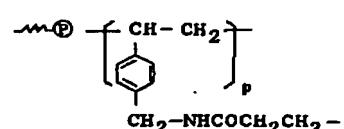
第2図のフローチャートに従つて、本発明化合物(同図の化合物⑩)を製造した。

第2図で、記号は次の意味を持つ。

B' ベンゾイル化アデニン

B アデニン

DMTr ジメトキシトリチル



R⁰ オルトクロロフェニル

Et エチル

CE - シアノエチル

m 2

n' 2

n 12

2) 化合物〔VI〕(第2回の④)の合成

実験1-1

ジメトキシトリナルアザノシン/樹脂〔④〕
 (樹脂は粗体に過ぎないが、樹脂に担持された目的化合物は外観的には樹脂そのものと変わらないので、樹脂に担持された当該化合物を以下において単に樹脂と呼ぶこととする) 300mg (0.033mmol) をイソプロパノール-塩化メチレン (15: 85, V/V) 溶液 10ml で3回洗浄後、臭化亜鉛の 1.0M のイソプロパノール-塩化メチレン溶液 8ml で5分間ずつ4回反応(脱トリチル化)させて樹脂〔④〕を得る。樹脂〔④〕をイソプロパノール-塩化メチレン溶液 10ml で3回洗浄し、これにジスクレオチド〔③〕150mg (0.1mmol) のピリジン溶液

を添加後、共沸させて系を無水とし、メチレンスルホニルニトロトリアゾリド(以下 MSNT と記す) 150mg (0.5mmol) と無水ピリジン 2ml を添加して90分間反応(縮合)させる。反応後、ピリジン 10ml で3回洗浄し、触媒量(約10mg)のジメチルアミノピリジン(以下 DMAP)を含む無水酢酸-ピリジン (1: 9, (V/V)) 溶液 10ml を添加し10分間反応させて未反応 5'-水酸基をアセチル化して保護し、これをピリジンで洗浄して、化合物〔④'〕(n = 2)を得る。以上のような操作を6回くり返して、化合物〔④〕(n = 12)を得る。

一方、5'-ヒドロキシ-ジスクレオチド〔⑥〕 800mg (0.71mmol) とオルトクロロフェニルホスホジトリアゾリトと後者のジオキサン溶液 (1.0mmol, 6ml) 中で2時間反応させ、続いてトリフルオロアセチル-6-アミノヘキサノール 300mg (1.4mmol) および 1-メチル-イミダゾール 115mg (1.4mmol) を加えてさらに2時間反応させる。反応終了後、溶媒を留去し、残渣をクロロホルムに溶解した後、水、0.5M リン酸二水

素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および5%の塩化ナトリウム水溶液でそれぞれ洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥する。クロロホルム層を濃縮後、シリカゲルカラムで精製(溶出液として0~4%のメタノール含有クロロホルムを使用)し、溶出液を濃縮後ベンタノン中に滴下し粉末状の化合物〔⑥〕を得る。

上記で合成した化合物〔④〕(n = 12) 115mg、(3.45mmol)を前述と同様の方法で脱トリチル化したもの〔⑦〕IC、化合物〔⑥〕60mg (0.04mmol) をトリエチルアミン-ピリジン-水 (1: 3: 1, V/V) 溶液 3ml で処理(脱シアノエチル化)した化合物〔⑥〕を加え、無水にしたのち、MSNT 50mg (0.2mmol) およびピリジン 1ml を加え90分間反応(縮合)させ、反応終了後ピリジンおよびメタノールで洗浄し、乾燥して、完全に保護されたオリゴヌクレオチド誘導体〔⑨〕を得る。

オリゴヌクレオチド誘導体〔⑨〕15mg を 0.5M テトラメチルダニジン-ピリジン-2-カルボアルドキシメイトのジオキサン-水 (9: 1、

(V/V) 溶液 200ml を加え、遠沈管中、室温で24時間反応させる。反応後、濃アンモニア水 (2.5ml) を加えて密閉し、50°C で一夜反応させる。反応終了後、沪過し、沪液を濃縮後、水に溶解させてからエーテルで抽出を行なう。水層を濃縮後、セファデックス G-50 (φ1.5×120cm、溶出液は 0.05M の重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液 pH 7.5) で脱塩精製しペンタデカアデニル酸誘導体〔⑩〕を得た。

また同様の方法で実験1-2、1-3および1-4のようなオリゴヌクレオチド誘導体を得た。以上で合成した化合物を第1表に示す。

第1表

序 号 実 験 体	化合物⑨の内容	
	m+n	(B) _{m+n} B
1-1	14	A A A A A A A A A A A A A A A A
1-2	14	T T T T T T T T T T T T T T T T
1-3	14	G G A T G C A T C A C C A C C
1-4	16	A A T C T G G T G A G A A G C G C

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

これら4種の化合物の高速液体クロマトグラフイーの結果を第3図に示す。A-Dは、それぞれ実験1-1~1-4の化合物についての図である。

3) ピオチン-ペントアデニル酸〔⑩〕の製造

実験2-1

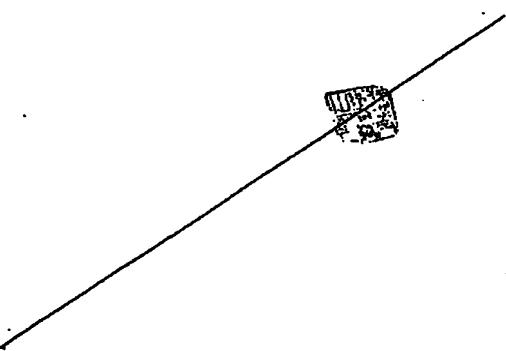
上記実験1-1で合成したペントアデニル酸導体〔⑨〕約1.0 ODを0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液(pH8.3)10μlに溶解し、ピオチンスクシンイミドエステルのジメチルホルムアミド溶液10μl(数百倍過剰に相当)を加えて4℃で一夜または室温で4時間反応させて、ピオチン-ペントアデニル酸〔⑩〕を合成する。

反応の確認は、高速液体クロマトグラフイーおよび20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行なつた。またその際、反応性の比較のため上記で合成したオリゴスクレオチド〔⑦〕を脱保護して得た5'-水酸基をもつ化合物〔⑨〕も同様にピオチンスクシンイミドエステルと反応させる。

特開昭59-148798(7)

上記実験1-2、1-3および1-4で合成した化合物〔⑨〕についても実験2-1と同様な操作を行なつて各々について化合物〔⑩〕を製造する。また、反応の比較のため5'-水酸基をもつ化合物〔⑨〕をも製造し、化合物〔⑩〕とピオチン活性エステルとを各々反応させる。このときの実験を各々実験2-2、2-3および2-4とした。

実験2で製造した化合物を第2表に示す。



化合物⑩の内部		化合物⑨の内部		化合物⑨の内部	
(B) _{m+n} B		(B) _n B		(B) _m B	
m+n		14	AAAAA.....A.....A	14	TTTTTTTTTTTTTTTT
n		12	AAAAA.....A.....A	12	TTTTTTTTTTTTTT
2-1	12	12	TTTTTTTTTTTT	12	ATGCATCACCAAC
2-2				12	ATGCATCACCAAC
2-3				14	TCTGGTGAAGCGC
2-4				14	AATCTGGTGAAGCGC

表2
結果

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

以上の結果を第4および5図(高速液体クロマトグラフイーの結果)および第6および7図(電気泳動の結果)に示す。

第4図は高速液体クロマトグラフイーの溶出パターンを示すものである。図中1は何れも反応前の化合物そのものの、2は何れもピオチンと化合物を混合したもの、3は何れも化合物とピオチン活性エステルとを反応させたもののクロマトグラムである。1は実験2-1で式〔⑩〕の化合物、2は実験1-1で式〔⑨〕である化合物、3は実験2-2で式〔⑩〕である化合物、4は実験1-2で式〔⑩〕である化合物について上記のような操作を行なつた際のクロマトグラムを示す。なおピーク上の数値は保持時間を示す。

第5図は高速液体クロマトグラフイーの溶出パターンを示すものである。図中の1は何れも反応前の化合物そのものの、2は何れもピオチンと化合物を混合したもの、3は何れも化合物とピオ

テン活性エステルとを反応させたもののクロマトグラムである。ホは実験2-3で式[49]の化合物、ヘは実験1-3で式[49]である化合物、トは実験2-4で式[49]の化合物の、チは実験1-4で式[49]の化合物について上記のような操作を行なつた際のクロマトグラムを示す。なお、ピーク上の数値は保持時間を示す。

第6図は電気泳動の結果を示すものである。(a)、(c)、(e)および(g)は、各々実験2-2の[49]、1-2の[49]、2-1の[49]および1-1の[49]の化合物の結果を示す。また、(b)、(d)、(f)および(h)は各々実験2-2の[49]、1-2の[49]、2-1の[49]および1-1の[49]の各々の化合物とビオテン活性エステルとを反応させた後の結果を示す。XCはキシレンシアノールの、BPBはプロモフェノールブルーのバンドをそれぞれ示しともに電気泳動の標識として用いるものである。なお図中で上がマイナス側、下がプラス側を示す。

第7図は電気泳動の結果を示すものである。(j)、(l)、(n)および(p)は各々実験1-4の[49]、2-4

の[49]、1-3の[49]および2-3の[49]の化合物の結果を示す。また、(i)、(k)、(m)および(o)は各々実験1-4の[49]、2-4の[49]、1-3の[49]および2-3の[49]の各々の化合物とビオテン活性エステルとを反応させた後の結果を示す。BPBは上記と同じ意味、また図中で上がマイナス側、下がプラス側を示す。

高速液体クロマトグラフィーによる結果(第4図および5図)からみれば、式[49]で示される5'-水酸基をもつ化合物(第4図イ-1、第4図ハ-1、第5図ホ-1および第5図ト-1)はビオテンと反応せず(第4図イ-3、第4図ハ-3、第5図ホ-3、および第5図ト-3)、終始单一ピークのままである。それに対してオリゴヌクレオチド誘導体[式[49]]はビオテンと反応させると、高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンに変化が生じて、原料のピーク(第4図ロ-1、第4図ニ-1、第5図ヘ-1および第5図チ-1)はなくなつており、ビオテン活性エステルと反応して新しい化合物(第4図ロ-3、第4図ニ-3、第5

図ヘ-3および第5図チ-3)ができるていることがわかる。なお、第4-5図ロ、ニ、ヘおよびチの2はビオテン活性エステルと化合物[49]とを混合し、第4-5図イ、ハ、ホおよびトの2はビオテン活性エステルと5'-水酸基をもつ化合物[49]とを混合して実験に行なつた反応の前後の溶出パターンと対比させたものであるが、これらを見比べてみても一級アミノ基を有する化合物[49]はビオテン活性エステルと選択的に反応し、5'-水酸基をもつ化合物[49]とは反応していないことがわかる。

一方第6図および第7図の電気泳動の結果から5'-水酸基化合物とビオテン活性エステルとの反応を見ると(a)-(b)、(e)-(f)、(k)-(l)および(o)-(p)参照)、反応前(a)、(e)、(k)および(p)のバンドの位置と反応後(b)、(f)、(l)および(o)のバンドの位置に相違が見られないことより、ビオテンとの反応は生じていないことがわかる。また、一級アミノ基を有するオリゴヌクレオチド(e)-(d)、(g)-(h)、(l)-(j)および(m)-(n)参照)とビオテン活

性エステルとの反応を見ると、反応前(e)、(g)、(j)および(n)のバンドの位置と反応後(d)、(h)、(l)および(m)のバンドの位置とが異なつてあり、ビオテンと反応していることがわかる。

以上の結果より、上記で合成した一級アミノ基を有する化合物は、ビオテン活性エステルと選択的に反応していることがわかる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の化合物を合成する方法の一例を示すフローチャートである。

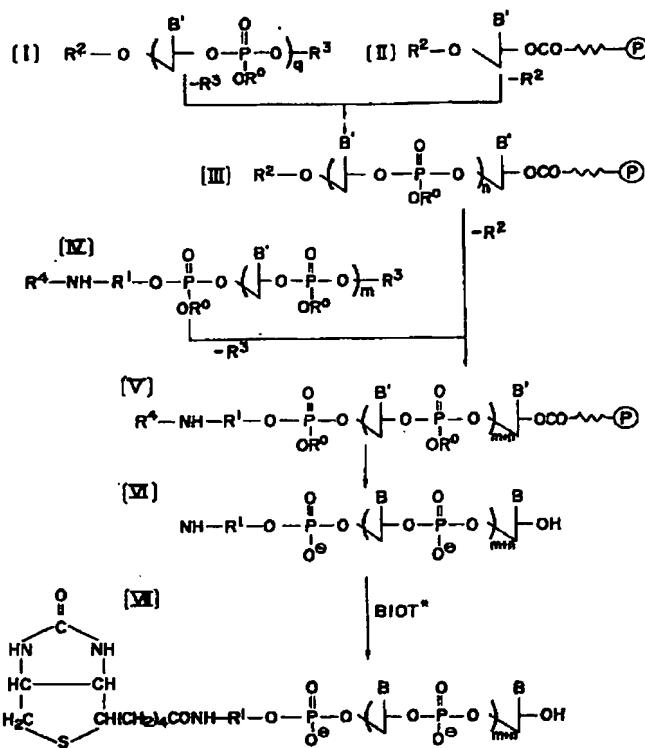
第2図は、実験例で示した本発明化合物の製造法のフローチャートである。

第3図A-Dは、実験例で示した化合物[49]の高速液体クロマトグラフィーの結果を示す図である。

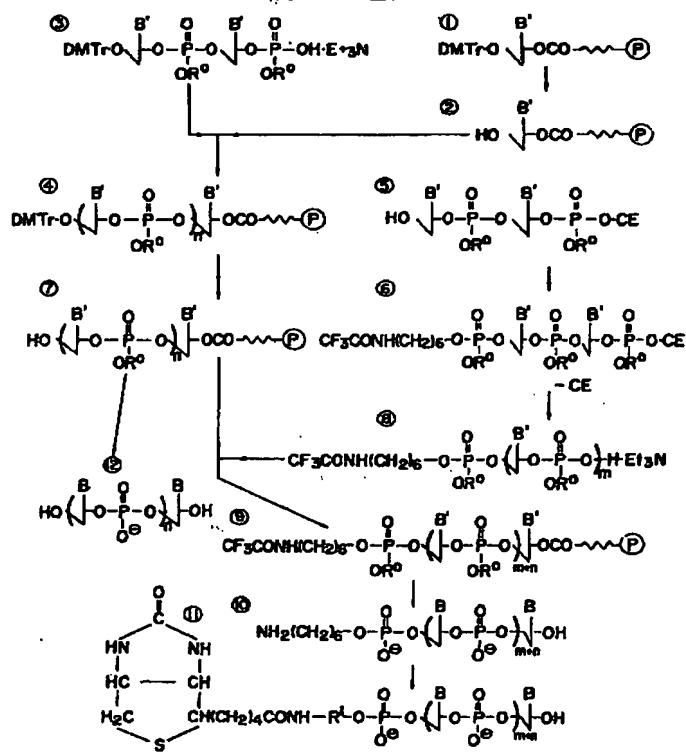
第4-5図は、いずれも高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示す図である。

第6-7図は、いずれも電気泳動の結果を示す図である。

卷一

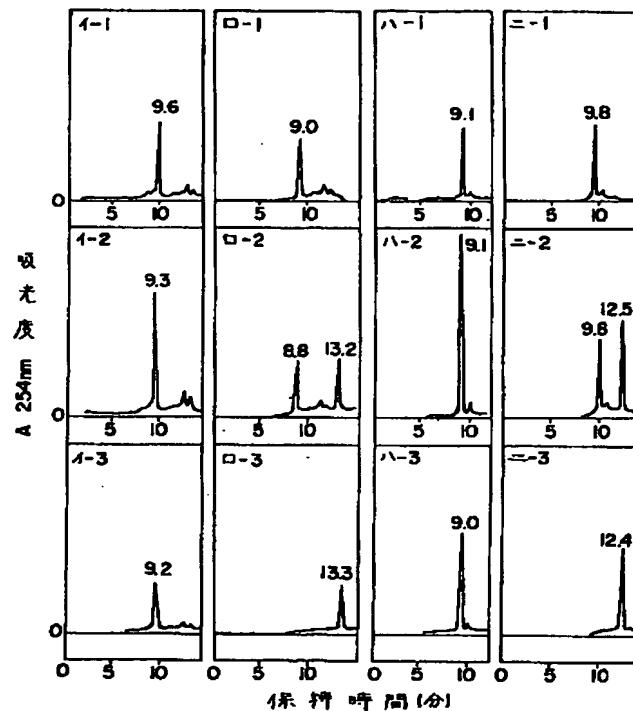
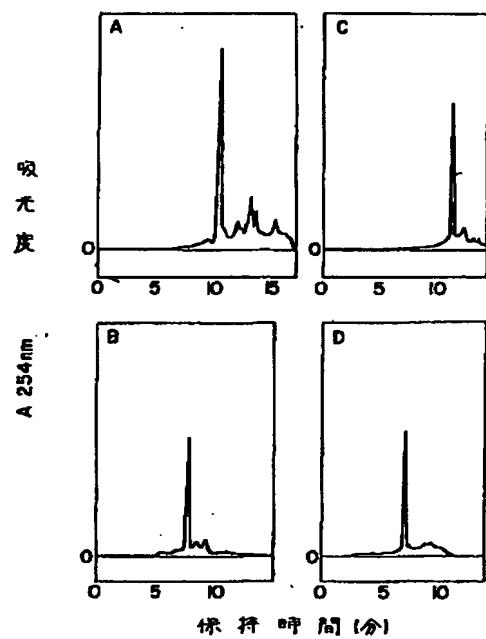


第 2 四

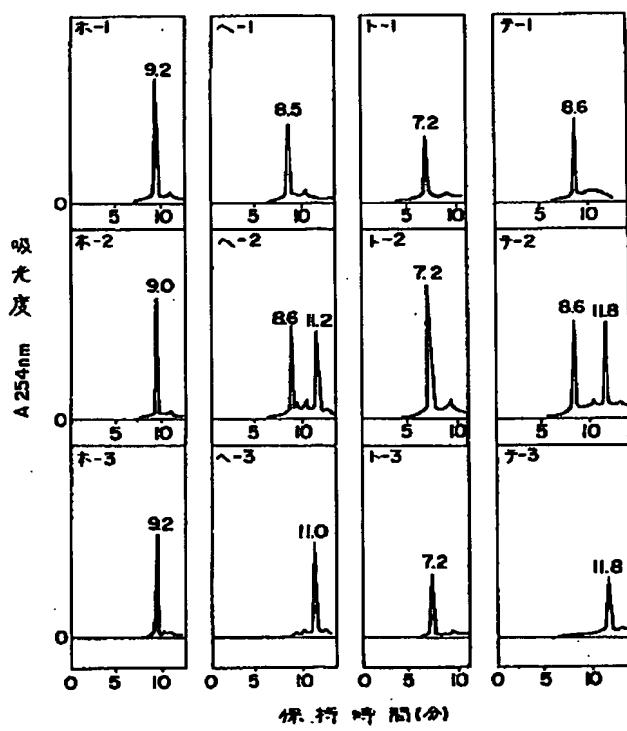


第4図

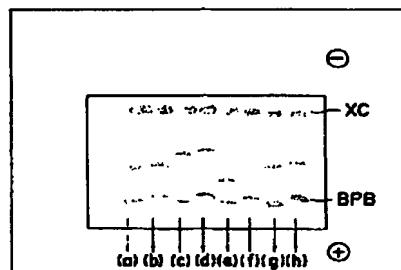
第3図



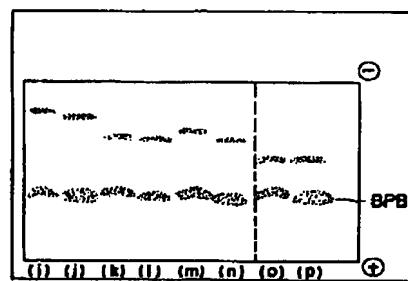
第5図



第6図



第7図



平成 1.12.-4 発行

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和 58 年特許願第 22516 号(特開昭
59-148798 号, 昭和 59 年 8 月 25 日
発行 公開特許公報 59-1488 号掲載)につ
いては特許法第 17 条の 2 の規定による補正があつ
たので下記のとおり掲載する。 3 (2)

Int. Cl.	識別記号	厅内整理番号
C07H 21/02 21/04		7417-4C 7417-4C

手 檄 刑 正 書

平成 1 年 8 月 25 日

特許庁長官 吉田文毅取
1 事件の表示

2 発明の名称

3. 纠正多支者

事件との関係 特許出願人
濁水製薬株式会社

4 代 理 人 (郵便番号 100)
東京都千代田区丸の内三丁目2番3号
〔電話東京 (211)2321 大代表〕

6428 井理士 佐 隆 一

5 補正命令の日付

発送日 平成 年 月 日

6 换正により減少する発明の数 1

7 構正の対象

「説第2許明」の各項の請求の範囲、
明細書及び図面の範囲並びに明細書
の範囲を明確に定めた。

8. 捕正の内容

(1) 発明の名称「ビオチンヌクレオチド誘導体およびその製造法」を「ビオチンヌクレオチド誘導体」に補正する。

(2) 特許請求の範囲を別紙の通り補正する。

(3) 明細書第4頁6～8行の「本発明は、……にも関する。」を削除する。

(4) 同書第5頁6～7行の「R N Aを錠型にして」を「R N Aに取り込ませて」に補正する。

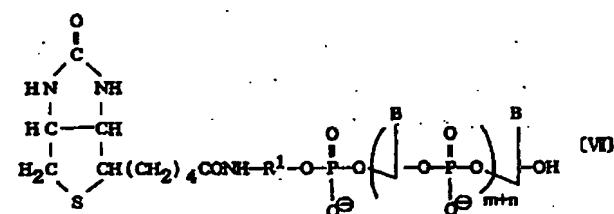
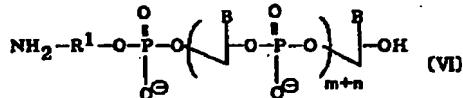
(5) 同書第6頁12行～最終行の「また、……〔VI〕」を削除する。

(6) 同書第8頁下から6～5行の「アフィニティカラム蛍光性染色体による」を「アフィニティカラム、蛍光性染色による」に補正する。

(7) 同書第10頁下から6行の「一つの好ましい方法は、」と「前記の式〔VI〕」の間に下記の内容を挿入する。

「下式〔VI〕で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の末端アミノ基にビオチンを結合させて下式〔VII〕で示されるビオチン・オリゴデオキシリボ

ヌクレオチドを得ること、を特徴とするものである。



【ただし、 m および n はそれぞれ0または任意の自然数であり、 R^1 は2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、 B はヌクレオチドを構成する塩基である（ B が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい）。】

すなわち、この方法は、

(8) 図書第13頁3~6行の各行の「Reserch」を「Research」に補正する。

(9) 同書第14頁下から2行の「COR⁴基」を「CO~~~~@基」に補正する。

(10) 同書第21頁最終行の「アルドキシメイト」を「アルドキシム」に補正する。

(11) 同書第23頁最終行の「と反応させる。」を「と反応させる（対照実験3-1）。」に補正する。

(12) 同書第24頁3行の「を製造する。」を「を製造する。これをそれぞれ実験2-2、2-3および2-4とした。」に補正する。

(13) 同書第24頁第5行の「をも製造し、」を「を用い、」に補正する。

(14) 同書第24頁7行の「実験2-2、2-3および2-4」を「実験3-2、3-3および3-4」に補正する。

(15) 同書第24頁8行の「実験2で製造した」を「実験2および3で使用した」に補正する。

(16) 同書第25頁の第2表を次のとおり補正する。

「第2表

誘 発 試 験 体 例	化合物②の内容		誘 発 試 験 体 例	化合物①の内容	
	n	(B) _n B		n+n	(B) _{n+n} B
3-1	12	AAAAAAAAAAAAAA	2-1	14	AAAAAAAAAAAAAA
3-2	12	TTTTTTTTTTTT	2-2	14	TTTTTTTTTTTT
3-3	12	ATGCATGACGCC	2-3	14	GGATGCATGACGCC
3-4	14	TCTGGTCAGAACGGC	2-4	16	AAATCTGGTCAGAACGGC

(17) 同書第26頁8~9行の「ビオチンと化合物を」を「反応前後の試料を」に補正する。

(18) 同書第26頁9~10行の「化合物とビオチン活性エステルとを反応させたものの」を「ビオチン活性エステルと反応させた後の」に補正する。

(19) 同書第26頁11行の「実験2-1」を「実験3-1」に補正する。

(20) 同書第26頁12行の「実験1-1」を「実験2-1」に補正する。

(21) 同書第26頁13行の「2-2……実験1

-2で」を「3-2……実験2-2で」に補正する。

(22) 同書第26頁14~15行の「上記のような操作を行なった際」を削除する。

(23) 同書第26頁下から4行~第27頁2行の「第5図は……クロマトグラムである。」を「第5図は同じく高速液体クロマトグラフィーの検出パターンを示し、」に補正する。

(24) 同書第27頁2行の「実験2-3」を「実験3-3」に補正する。

(25) 同書第27頁3行の「実験1-3」を「実験2-3」に補正する。

(26) 同書第27頁4行の「2-4で……実験1-4で」を「3-4で……実験2-4」に補正する。

(27) 同書第27頁5~6行の「上記のような操作を行なった際」を削除する。

(28) 同書第27頁9~10行の「実験2-2の【②】、1-2の」を「実験3-2の【②】、2-2の」に補正する。

(29) 同書第27頁10~11行の「2-1の……化合物」を「3-1の【②】および2-1の【④】の反応前の化合物」に補正する。

(30) 同書第27頁12行の「実験2-2……、2-1」を「実験3-2の【②】、2-2の【④】、3-1」に補正する。

(31) 同書第27頁13行の「1-1の」を「2-1の」に補正する。

(32) 同書第27頁最終行の「実験1-4の【④】、2-4」を「実験2-4の【④】、3-4」に補正する。

(33) 同書第28頁1~2行の「1-3の……化合物」を「2-3の【④】および3-3の【④】の反応前の化合物」に補正する。

(34) 同書第28頁3~4行の「実験1-4……および2-3」を「実験2-4の【④】、3-4の【④】、2-3の【④】および3-3」に補正する。

(35) 同書第29頁2~11行の「なお、第4~5図……ことがわかる。」を「なお、中間の高

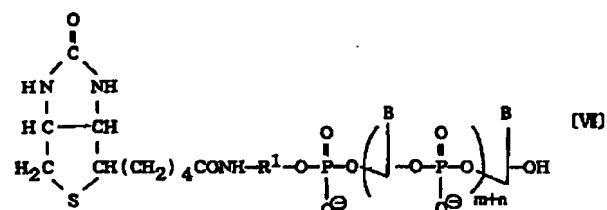
平成 1.12. -4 発行

液体クロマトグラフィーのパターンは、保持時間の差異を明確にするため、反応の前後の化合物を混合し溶出パターンと対比させたものである。」に補正する。

(96) 図面の第1図および第2図を別紙のとおり補正する。

特許請求の範囲

1. 下式 [VI] で示されるビオチン・オリゴデオキシリボヌクレオチドであることを特徴とする、ビオチンヌクレオチド誘導体。



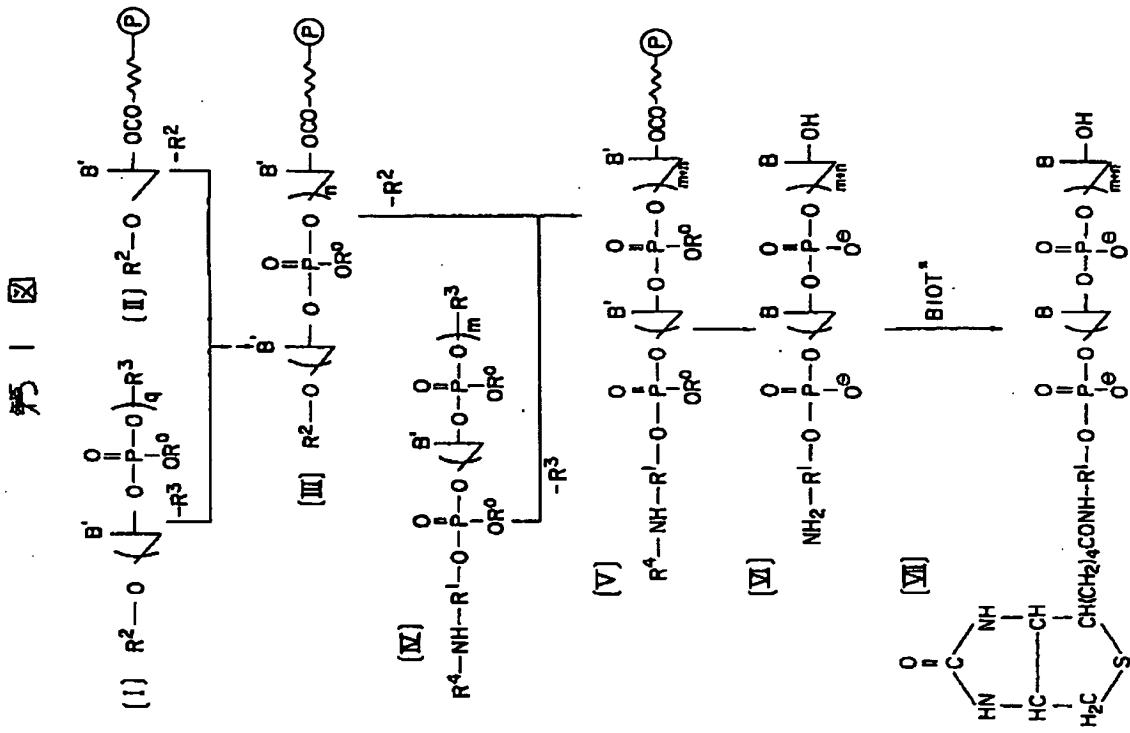
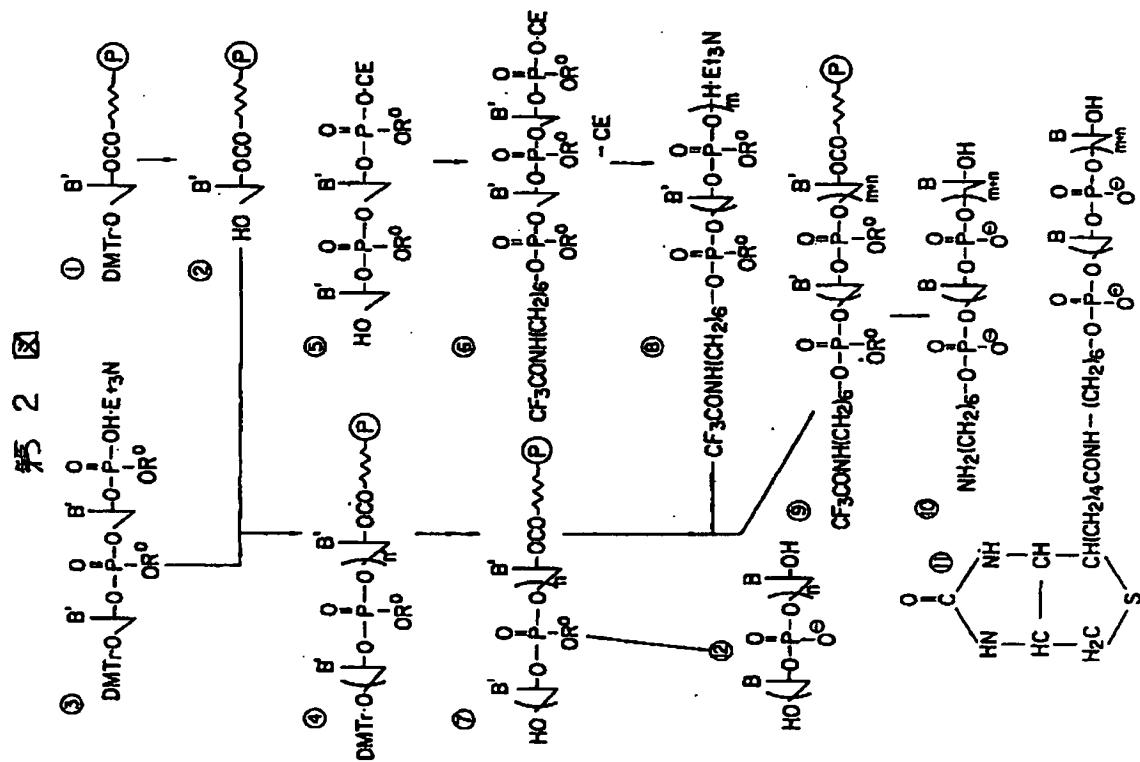
【ただし、m および n はそれぞれ 0 または任意の自然数であり、R¹ は 2 個の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、B はヌクレオチドを構成する塩基である（B が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい）。】

2. 塩基 B がアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第1項記載のビオチンヌクレオチ

ド誘導体。

3. R¹ が炭素数 2 ~ 20 の直鎖または分岐鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第1項または第2項記載のビオチンヌクレオチド誘導体。

4. m が 0 または 5 までの自然数、n が 0 または 40 までの自然数である、特許請求の範囲第1 ~ 3 項のいずれか一項に記載のビオチンヌクレオチド誘導体。



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.